

学校编码: 10384

学号: 200426085

分类号_____密级_____

UDC_____

厦门大学

硕士学位论文

外源 *PHSP1* 基因在大肠杆菌和烟草中的
表达及分析

Studies on PHSP1 Gene Expression in Escherichia coli
and Nicotiana tobacum

云 叶

指导教师姓名: 杨 盛 昌 副教授

专业名称: 发育生物学

论文提交日期: 2007 年 6 月 9 日

论文答辩时间: 2007 年 7 月 9 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 田惠桥 教授

评 阅 人: _____

2007 年 7 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：_____

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

保密（ ），在 年解密后使用本授权书。

不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

| | |
|-----------------------------------|----|
| 目 录 | |
| 摘 要..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 第一章 前言..... | 4 |
| 1.1 热激蛋白..... | 4 |
| 1.1.1 热激蛋白的定义..... | 4 |
| 1.1.2 热激蛋白的分类..... | 4 |
| 1.1.3 热激蛋白的定位..... | 5 |
| 1.1.4 热激蛋白的特征..... | 5 |
| 1.1.5 热激蛋白基因表达的调控..... | 6 |
| 1.2 HSP70s..... | 7 |
| 1.2.1 HSP70s 的分类..... | 8 |
| 1.2.2 HSP70s 的分子结构..... | 10 |
| 1.2.3 HSP70s 的功能..... | 13 |
| 1.3 本课题研究的目的地及意义..... | 18 |
| 1.3.1 烟草概况..... | 18 |
| 1.3.2 PHSP1 基因..... | 18 |
| 1.3.3 本研究的思路及意义..... | 19 |
| 第二章 材料与方法..... | 20 |
| 2.1 实验材料..... | 20 |
| 2.2 实验方法..... | 23 |
| 第三章 结果与分析..... | 33 |
| 3.1 原核表达载体的构建及表达..... | 33 |
| 3.1.1 pMD18-T-PHSP1 质粒的构建..... | 33 |
| 3.1.2 pET-28a-PHSP1 质粒的构建及鉴定..... | 33 |
| 3.1.3 pET-His-PHSP1 质粒的构建及鉴定..... | 36 |
| 3.1.4 PHSP1 在大肠杆菌中的表达及条件优化..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.5 PHSP1 蛋白的 Western blotting 分析 | 40 |
| 3.2 植物表达载体的构建及表达 | 42 |
| 3.2.1 植物表达载体 pBI121- <i>PHSP1</i> 的构建 | 42 |
| 3.2.2 转基因烟草植株的获得 | 42 |
| 3.2.3 转基因烟草分子鉴定 | 43 |
| 3.3 NaCl 对转基因烟草的影响 | 45 |
| 3.3.1 野生型与转基因烟草的表型分析 | 45 |
| 3.3.2 野生型和转基因烟草叶片酶活性变化 | 45 |
| 第四章 讨论 | 48 |
| 4.1 原核表达载体的构建及表达 | 48 |
| 4.2 植物表达载体的构建及表达 | 50 |
| 4.3 <i>PHSP1</i> 与烟草的抗盐性 | 53 |
| 结 论 | 55 |
| 参考文献 | 56 |
| 缩略词对照表 | 61 |
| 致谢 | 63 |

Contents

| | |
|--|-----------|
| Abstract in Chinese | 1 |
| Abstract in English | 2 |
| Chapter 1 Introduction | 4 |
| 1.1 Heat shock proteins..... | 4 |
| 1.1.1 Definition of heat shock proteins..... | 4 |
| 1.1.2 Classification of heat shock proteins | 4 |
| 1.1.3 Location of heat shock proteins | 5 |
| 1.1.4 Characterization of heat shock proteins..... | 5 |
| 1.1.5 Regulation of <i>HSP</i> expression | 6 |
| 1.2 HSP70s | 7 |
| 1.2.1 Classification of HSP70s | 8 |
| 1.2.2 Structure of HSP70s..... | 10 |
| 1.2.3 Function of HSP70s | 13 |
| 1.3 Objectives and Scientific significance of the study | 18 |
| 1.3.1 Tobacco..... | 18 |
| 1.3.2 <i>PHSP1</i> gene | 18 |
| 1.3.3 Thoughts and purpose of the study | 19 |
| Chapter 2 Materials and methods | 20 |
| 2.1 Materials | 20 |
| 2.2 Methods..... | 23 |
| Chapter 3 Results and analysis | 33 |
| 3.1 Construction and expression of prokaryotic expression vectors | 33 |
| 3.1.1 Construction of pMD18-T- <i>PHSP1</i> | 33 |
| 3.1.2 Construction and identification of pET-28a- <i>PHSP1</i> | 33 |
| 3.1.3 Construction and identification of pET-His- <i>PHSP1</i> | 36 |
| 3.1.4 <i>PHSP1</i> expression and optimization in <i>E. coli</i> | 38 |
| 3.1.5 Western blotting analysis of PHSP1 | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Construction and expression of plant expression vector | 42 |
| 3.2.1 Construction of pBI121- <i>PHSP1</i> | 42 |
| 3.2.2 Obtainment of transgenic plants | 42 |
| 3.2.3 Molecular analysis of transgenic tobacco | 43 |
| 3.3 Effect of NaCl on transgenic tobacco | 45 |
| 3.3.1 Analysis of phenotype of wild type and transgenic tobacco..... | 45 |
| 3.2.2 Changes of enzyme activities in leaves of wild type and transgenic tobacco | 45 |
| Chapter 4 Discussion | 48 |
| 4.1 Construction and expression of prokaryotic expression vectors | 48 |
| 4.2 Construction and expression of plant expression vector | 50 |
| 4.3 <i>PHSP1</i> and NaCl tolerance of tobacco plants | 53 |
| Conclusion | 55 |
| References | 56 |
| Abbreviations | 61 |
| Acknowledgements | 63 |

摘 要

PHSP1, 豌豆 (*Pisum sativum*) 线粒体热激蛋白 70 (mitochondrial heatshock protein, mtHSP70) 基因, 其编码产物为 HSP70 家族成员, 在线粒体前体蛋白跨膜转运中起着重要作用。

本研究首先利用基因工程方法构建了原核表达载体 pET-28a-*PHSP1* 和 pET-His-*PHSP1*。将重组质粒 pET-28a-*PHSP1* 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 0.5mmol/L IPTG (异丙基 β -D- 硫代半乳糖苷) 37℃ 诱导 4h, 12% SDS-PAGE 电泳, 可见一分子量约为 70 kDa 的蛋白条带, 用抗 mtHSP70 特异性抗体进行 Western blotting 杂交检测, 证实该表达蛋白确是 PHSP1 蛋白。进一步优化了外源 *PHSP1* 基因在大肠杆菌中的表达条件 (IPTG 浓度、温度、时间), 表明 0.25mmol/L IPTG、37℃、诱导 5h, 目的蛋白表达量最高。该外源基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达量高于 ER2566, pET-28a-*PHSP1* 在 BL21(DE3) 中表达量高于 pET-His-*PHSP1*。

其次, 构建了植物表达载体 pBI121-*PHSP1*, 将 *PHSP1* 基因置于 CaMV35S 启动子控制之下, 通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 介导, 将 *PHSP1* 基因转入烟草叶片组织中。30d 后, 经卡那霉素筛选获得抗性苗。对获得的抗性苗进行 PCR 扩增和 Western blotting 检测, 证实目的基因成功整合到烟草基因组并得以表达。

对野生型和转基因烟草进行盐胁迫处理 (0、100、300mmol/L NaCl, 时间为 0、6、24、48h), 发现 300mmol/L NaCl 胁迫 48h 后, 野生型烟草叶片损伤程度较转基因烟草严重。进一步测定叶片 SOD (超氧化物歧化酶)、POD (过氧化物酶) 活性、CAT (过氧化氢酶)。结果表明, 随着盐浓度提高及胁迫时间延长, 三种酶活性变化不同, 但同一处理下, 转基因烟草酶活性始终高于野生型。表明转 *PHSP1* 基因在盐胁迫条件下减缓了保护酶活性的降低, 有利于提高烟草抗氧化能力及耐盐性。

关键词: 热激蛋白; *PHSP1*; 表达; 烟草; 耐盐性

Abstract

PHSP1, the cDNA for mtHSP70 (mitochondrial heat shock protein, mtHSP70) has been isolated from *Pisum sativum*. The protein encoded by *PHSP1* is a homologue of the mtHSP70 proteins, involving in the translocation of pre-proteins across the inner mitochondrial membrane during the process of mitochondrial protein import.

In the study, *PHSP1* was sub-cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a and pET-His using recombinant DNA techniques. Transforming pET-28a-*PHSP1* into BL21(DE3) cells and were grown at 37°C to mid log phase. Protein expression was induced by addition of 0.5mmol/L IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside). 4 hours later, bacterial proteins were separated by 12% SDS-PAGE. A new protein with MW approximately 70kDa was observed. With anti-mtHSP70 antibodies, Western blotting hybridization experiment confirmed this new protein as mtHSP70 (PHSP1). With the change of IPTG and culturing conditions, different PHSP1 expression yields were induced, in which maximum PHSP1 expression yields were observed at 0.25mmol/L IPTG, 37°C and 5 hours after induction. *E. coli* BL21(DE3) cells, transformed by pET-28a-*PHSP1*, expressed more PHSP1 than ER2566. pET-28a-*PHSP1* had better expression than pET-His-*PHSP1* in BL21(DE3) cells.

Plant expression plasmid pBI121-*PHSP1* was constructed for transformation, including a strong, constitutive 35S promoter of Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), which can be highly expressed in eukaryotic cell. Tobacco leaf disks were infected and pBI121-*PHSP1* was transformed into tobacco cells by the *Agrobacterium*-mediated transformation techniques with EHA105. Transformants were selected on the basis of resistance to the antibiotic kanamycin. After 30 days' culture, we successfully got transformed seedlings. PCR technique proved that extra *PHSP1* gene existed in the seedlings. By Western blotting hybridization, more mtHSP70 had been found in transgenic seedlings. The results indicated that *PHSP1* gene has been integrated into the chromosomal DNA of these transgenic plants and

normally expressed.

NaCl treatments (0, 100, 300 mmol/L NaCl) were applied to the leaves of wild type t and transgenic tobacco for 0, 6, 24, 48 hours. We found that leaves of wild type tobacco were injured more seriously than transgenic tobacco at 300mmol/L NaCl after 48 hours. Leaf SOD (superoxide dismutase), POD (peroxidase) and CAT (catalase) activities had different changes with the rise of NaCl concentration and extending time. But at same treatment condition, transgenic tobacco leaves always had higher SOD, POD and CAT activities than wild type. We concluded that *PHSP1* expression in transgenic tobacco protected or stabilized the structure of three enzymes under NaCl treatment. Therefore, transgenic tobacco had higher resistance to NaCl stress.

Key words: Heat shock proteins; *PHSP1*; Expression; Tobacco; Salt tolerance

第一章 前言

1.1 热激蛋白

1962 年, Ritossa 等 (1962) 观察到将果蝇幼虫的饲养温度从 25℃ 提高到 30℃, 30min 后, 其唾液腺多丝染色体上出现了特殊的“膨突”, 提示该区域的基因转录增强, Ritossa 称之为热激反应。Tissieres 等 (1974) 证实, 由于温度升高, 染色体膨突区域基因转录增强, 相应生成了分子量为 70kDa 和 26kDa 等一系列蛋白质, 即热激蛋白 (heat shock protein, HSP)。进入 80 年代, Nover (1984) 和 Sorger 等 (1987) 先后阐明了 HSP 的序列、基因结构及位点, 并确定是由于高热导致该基因中保守的上游调节序列即热休克元件 (heat shock element, HSE) 发生变化, 由此引起热激应答, 并激活该基因转录编码合成 HSP。

1.1.1 热激蛋白的定义

高于正常生长温度 5℃ 以上的温度即可称为热激 (heat shock, HS)。热激条件下, 生物体大部分正常蛋白质的合成和 mRNA 的转录被抑制, 同时迅速合成一些新的蛋白质即热激蛋白, 这种现象叫做热激反应 (heat shock response, HSR)。

现已证明, 从细菌到人的所有生物都可对应激产生反应。除温度以外, 其它许多因子如氨基酸类似物、高盐浓度、厌氧、水分胁迫、低温、重金属离子、亚砷酸盐、乙醇、营养饥饿、2,4-D、ABA、紫外线、缺氧、乙醇、葡萄糖缺乏、水分胁迫、胞外 pH 值变化、病原入侵、低温处理等, 均可诱导细胞产生 HSP (Vierling, 1991)。

除诱导以外, 正常生活的细胞中也有 HSPs, 这类 HSPs 是组成型表达的, 称为 HSC (heat shock cognate protein)。HSC 和诱导型 HSP 在结构和功能上都很困难区分, 统称为 HSP。Ubi (ubiquitin, 泛素) 是一种依赖 ATP 促进细胞蛋白质水解的小分子量热激蛋白。PDI (protein disulphide-isomerase, 蛋白质二硫键异构酶) 也被认为是一种热激蛋白。

1.1.2 热激蛋白的分类

依据热激蛋白在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上的表现分子量的不同, 将热激蛋白分成 HSP110s、HSP90s、HSP70s、HSP60s 和分子量在 15kDa-30kDa 之间的 LMW HSPs (low molecular weight HSPs) 或 smHSPs (small HSPs) 五个家族。HSP60s 以上的又可以称为 HMW HSPs (high molecular

weight HSPs) 或 laHSPs (large HSPs)。SmHSPs 又可以分为细胞质 I 类 smHSPs、细胞质 II 类 smHSPs、叶绿体 smHSPs、线粒体 smHSPs 和内膜 smHSPs 等(Vierling, 1991)。

1.1.3 热激蛋白的定位

热激蛋白定位于细胞的多种细胞器, 包括细胞质、叶绿体、线粒体和内膜系统(Vierling, 1991)。

1.1.4 热激蛋白的特征

1.1.4.1 热激蛋白的高度保守性

热激蛋白(HSP)是至今所发现的最保守的蛋白质之一。第一, 即使是亲缘关系很远的原核生物和真核生物, 它们的热激蛋白也同样具有很高的同源性。例如, 真核生物的热激蛋白70和大肠杆菌的热激蛋白70即DnaK蛋白的同源性大于65%。第二, 不同物种之间相同细胞器如细胞质HSP70之间的同源性, 比同一物种不同细胞器的HSP70之间的同源性高。玉米、矮牵牛、拟南芥、大豆、豌豆、绿藻等细胞质HSP70氨基酸的同源性达75.0%, 但与番茄HSP70(定位于内质网)比较, 同源性只有54.9%。同样, 豌豆、大豆、拟南芥、小麦4种细胞质 I 类smHSPs氨基酸之间的同源性也较高, 为68.2-85.1%。这似乎反应了不同细胞器HSP70之间很早的分歧(divergence)。第三, 同种植物不同类型的HSP的同源性较低, 例如豌豆HSP18.1、HSP17.7、HSP22.7和HSP21分别属于不同的类型, 它们之间的同源性低于50%。热激蛋白(HSP)的高度保守性说明它们在生物的生命活动中起着重要的作用(Vierling, 1991)。

1.1.4.2 热激反应的短时性

HSP的合成通常在高于正常生长温度5℃时就开始检测到, 温度继续增加到最适热激诱导温度时, HSP合成占蛋白质合成的百分比大大增加, 但超过最适热诱导温度后, 总蛋白合成急剧下降, 此时主要合成HSP(曹宏, 1999)。Northern blotting分析表明, 热激3-5 min就可检测到大豆幼苗HSP mRNAs的积累, 1-2 h 达到高峰, 6 h后显著下降, 12 h就检测不到了(Kimpel et al., 1990)。放射性标记显示, 氨基酸渗入热激蛋白在4h达到高峰, 随后就开始下降。但是28℃和40℃加入Aze (azetidine-2-carboxylic acid 三甲叉亚胺甲酸, 氨基酸类似物), 12 h后热激蛋白的合成仍然没有改变, 似乎Aze和高温诱导热激蛋白合成的机理不同(Lee et

al., 1996)。植物HSP110s比其它热激蛋白合成的时间更短，主要在热激的第一小时内合成（Vierling, 1991）。

1.1.4.3 热激蛋白的多样性

HSPs种类很多，分子量从15 kDa-110 kDa或更高，定位于多种细胞器。如前所述，通常根据分子量大小分为laHSPs和smHSPs两类。laHSPs在动物中较多，植物中较少，大多数植物常见的有68、70、83、92 kDa等。此外，分子量更大的如番茄的HSP95、大麦的HSP99、小麦的HSP103、棉花的HSP100、烟草的HSP100和120、大豆的HSP110等（Meyer and Chartier, 1983; Burke et al., 1985; Necchi et al., 1987）。植物热激蛋白的显著特点是smHSPs相当多，如大豆有27种分子量在15-25 kDa之间的smHSPs，其中6种是增加合成，21种是诱导合成。已研究过的植物大多都有20种左右的smHSPs。

1.1.5 热激蛋白基因表达的调控

热激时HSP基因转录被激活，多数正常蛋白质基因的转录被抑制，同时正常温度下存在的大多数mRNA的翻译降低或停止。生物体优先翻译HSP mRNAs，合成HSPs，并迅速对热激作出反应（Brodl, 1989; Gurly and Key, 1991）。关于HSP基因表达的信号传递途径目前还不清楚，由于诱导HSP合成的逆境可直接损伤蛋白质或合成异常蛋白质，因此认为异常蛋白质的积累激活了HSP基因（Ananthan et al., 1986）。氨基酸类似物也能诱导HSP合成，但其渗入可能破坏蛋白质的功能。例如培养果蝇时加入氨基酸类似物刀豆氨酸（canavanine），合成的HSP没有功能，也不能选择定位。因此合成有功能的HSP对热激蛋白基因表达的正常调节十分重要（DiDomenico et al., 1982）。Lee等（1996）报道在筛选到的9种HSP cDNA克隆中，相应的mRNA都可在热激（40℃）时诱导，其中7种可由Pro类似物（Aze）诱导，不被诱导的GmHsp20.7和pFS2033分别定位于叶绿体和内膜。能被诱导的GmHsp22.5和pFS2033非常相似，氨基酸同源性达78%，属于同一类型，可见同类基因不同个体的调控机理并不一样，且Aze和热诱导的mRNAs转录的时间、数量也有差异。

已经发现细胞内存在的热激因子（heat shock factor, HSF）在热激条件下可以激活热激基因的表达。热激基因的5'端有一小段特异的DNA序列，称为热激元件（HSE），是HSF的结合部位。HSF和HSE结合就会激活热激基因的表达。

Morimoto (1993) 提出热激基因表达的调节模式：正常条件下，HSF通过与HSP70的相互作用来保持不与DNA结合的非活性状态，热激时，错误折叠的和凝集的蛋白质与HSP70竞争结合HSF，解除了抑制HSF和DNA结合的因素，HSF组装成具有DNA结合活性的三聚体并结合到HSE上，激活热激基因的表达，合成热激蛋白，包括HSP70，当HSP70积累到一定程度又和HSF结合，使其回复无活性的单体形式，HSF和HSE分离，转录停止（图1-1）。

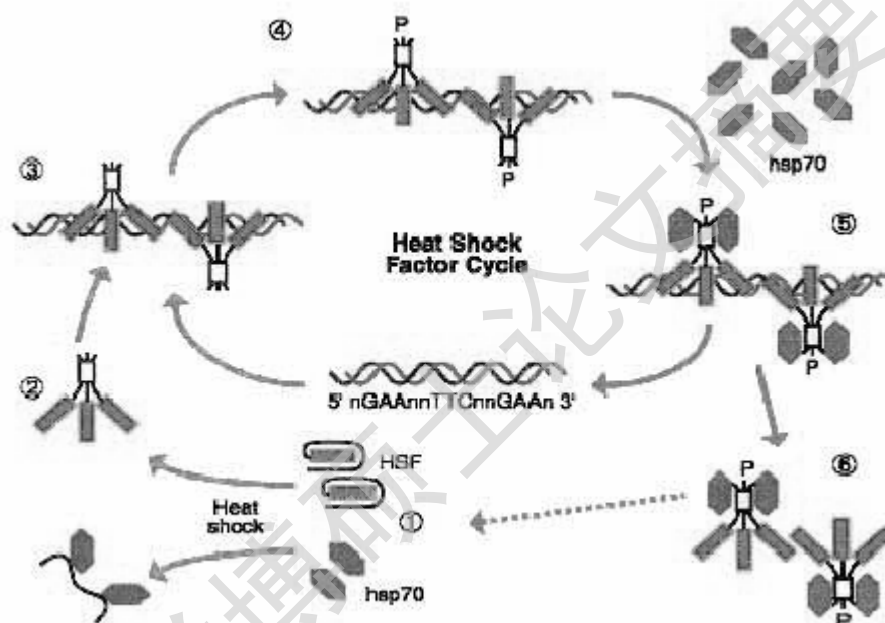


图 1-1 HSF 调控模型

Fig.1-1 The regulation model of HSF

①非应激细胞中，HSF 以无活性的单体形式与 HSP70 结合；②应激条件下，增加的变性蛋白竞争结合 HSP70，HSF 从 HSF-HSP70 复合体中解离，三聚化形成同源三聚体，暴露出 DNA 结合区和 NLS（核定位序列）；③在 NLS 介导下 HSF 三聚体进入胞核结合 *HSP* 基因启动子内的特定区域；④HSF 磷酸化开启 *HSP* 的转录；⑤当 HSP70 转录过量时又与 HSF 结合；⑥HSF 从 DNA 上脱落恢复单体结构。

1.2 HSP70s

热激蛋白70家族是分子量在70kDa左右的一个多基因族，是一类最保守最重要的热应激蛋白家族，包括分子量为68、72、73、75、78kDa等多种蛋白，它们具有相同的等电点和胰蛋白酶肽谱。正常生长的细胞中也有大量的热激蛋白70，

应激后含量增加。

热激蛋白70通常被称为分子伴侣（chaperones），帮助新生肽链正确折叠并协助蛋白质在细胞间转运。HSP70s具有高度的保守性，从原核生物到真核生物，不仅基因序列同源性高，而且在真核生物中热诱导表达的分子机制也基本相同：在HSP70基因上游都有保守性很强的热激元件（HSE）序列，热激后细胞中的热激因子（HSF）与HSE结合从而诱导热激蛋白70的表达。热激蛋白70基因家族很复杂，被称为超级基因家族（super gene family），在酵母中已经发现有9个热激蛋白70的同源基因，而在人类基因组中，至少有10个热激蛋白70基因，其中一些在热激或其它压力条件下特异表达，另一些则恒定存在于不同的细胞器中，称为HSC70。

1.2.1 HSP70s 的分类

HSP70s存在于所有细胞器中（Vierling, 1991; Boston et al., 1996; Miernyk, 1997），包括细胞质、内质网（endoplasmic reticulum, ER）（Munro and Pelham, 1986; Normington et al., 1989; Rose et al., 1989）、线粒体（Engman et al., 1989; Leustek et al., 1989; Amir-Shapira et al., 1990）和植物叶绿体（Amir-Shapira et al., 1990; Marshall et al., 1990）。ER中的HSP70又称BiP或GRP，原核生物如大肠杆菌的HSP70就是DnaK蛋白，在酵母中即是KAR2。从细菌到人的所有生物都有HSP70，包括组成型HSC70和诱导表达的HSP70两类（Gething and Sambrook, 1992），仅根据氨基酸顺序通常很难把二者区别开来，但是应用单克隆抗体可以区别哺乳动物细胞系中诱导型和组成型的HSPs。真核生物中的HSP70s是由多基因超家族编码的高度保守的蛋白，包括三类：细胞质HSP70s；ER中的GRP70s或BiP，与蛋白质的折叠运输有关；线粒体和叶绿体HSP70s，这类蛋白质与大肠杆菌的DnaK蛋白很相似（Vierling, 1991）。

1.2.1.1 细胞质 HSP70s

真核生物所有组织的细胞质中都有组成型HSC70，同时HSP70也受温度等诱导（Lindquist, 1986; Chen et al., 1990）。植物中已经分离了玉米（Rochester et al., 1986）、番茄（Duck et al., 1989）、矮牵牛（Winter et al., 1988）、拟南芥（Wu et al., 1988）、大豆（Roberts and Key, 1991）、豌豆（DeRocher et al., 1990）和绿藻（von Gromoff et al., 1989）编码HSP70的部分基因。除番茄定位于ER的BiP

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库